PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-110894
(43)Date of publication of application : 28.04.1997

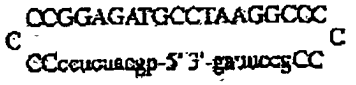
(51)Int.CI. C07H 21/02
A61K 31/70
A61K 48/00
C07H 21/04
C12N 15/09

(21)Application number : 07-268442
(22)Date of filing : 17.10.1995

(71)Applicant : SOYAKU GIJUTSU KENKYUSHO:KK
(72)Inventor : TAKAKU HIROSHI
TAKAI KAZUYUKI
ISHIBASHI TOSHIAKI
YAMAKAWA HIDESHI

(54) HYBRIC DNA/RNA OLIGONUCLEOTIDE AND ANTIVIRAL AGENT

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new nucleic acid having plural hairpin loop portions, with the intramolecular base sequence composed by an anti-sense DNA complementary to the target RNA and a sense RNA, having nuclease resistance, thus useful as, e.g. an antiviral agent.
SOLUTION: This new hybrid DNA/RNA oligonucleotide has a base sequence of the formula (A is an adenosine residue; T is a thymidine residue; G is a guanosine residue; C is a cytidine residue; (a), (u), (g) and (c) are each corresponding ribonucleotide, the linkage between nucleotides is phosphodiester linkage; (p) is a phosphate group), etc., having at least two hairpin loop portions, with the intramolecular base sequence composed by an anti-sense DNA complementary to the target RNA and a sense RNA, and having resistance to the decomposing action by various kinds of nuclease in vivo, therefore being useful as e.g. an antiviral agent against virus such as HIV.



LEGAL STATUS
[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]

NUC 23992

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報（Ａ）**　(11)特許出願公開番号

特開平9－110894

(43)公開日　平成９年(1997)４月28日

(51)Int.Cl.[6]		識別記号	庁内整理番号	ＦＩ		技術表示箇所
Ｃ０７Ｈ	21/02			Ｃ０７Ｈ	21/02	
Ａ６１Ｋ	31/70	ＡＤＹ		Ａ６１Ｋ	31/70	ＡＤＹ
	48/00				48/00	
Ｃ０７Ｈ	21/04			Ｃ０７Ｈ	21/04	Ｚ
Ｃ１２Ｎ	15/09	ＺＮＡ	9162－4Ｂ	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ

審査請求　未請求　請求項の数13　ＯＬ　（全 10 頁）

(21)出願番号　特願平7－268442

(22)出願日　平成７年(1995)10月17日

(71)出願人　592198703
株式会社創薬技術研究所
福島県福島市松川町美郷四丁目１番地の１

(72)発明者　高久　洋
千葉県船橋市習志野台１丁目６－８

(72)発明者　高井　和幸
千葉県千葉市花見川区朝日ケ丘町3204－51

(72)発明者　石橋　利明
千葉県千葉市花見川区西小中台町５丁目６棟301号

(72)発明者　山川　秀史
千葉県船橋市前原西４丁目６－15　プレイスセトル203号

(74)代理人　弁理士　佐々木　功　（外１名）

(54)【発明の名称】　ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド及び抗ウイルス剤

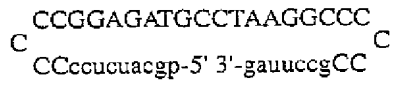
(57)【要約】

【課題】　ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドを含有する抗ウイルス剤を提供する。

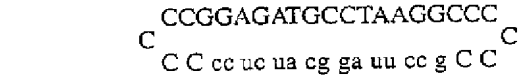
【解決手段】　ヘアピンループ部分を少なくとも２つ有しており、標的ＲＮＡに相補的なアンチセンスＤＮＡとセンスＲＮＡとにより分子内塩基配列が組まれているハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドである。このヌクレオチドは標的部位の RNase H により自己のセンスＲＮＡ領域が分解され、これによって露呈したアンチセンスＤＮＡ領域が標的となるＲＮＡと二重鎖を形成して標的ＲＮＡを分解する。

【効果】　本発明によるオリゴヌクレオチドは自体安定な塩基対を形成し、生体に存在する各種のヌクレアーゼによる分解作用に対して耐性を有している。

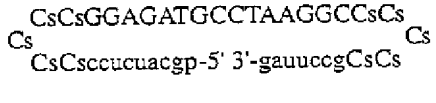
【特許請求の範囲】
【請求項１】　少なくともヘアピンループ部分を２つ有しており、標的ＲＮＡに相補的なアンチセンスＤＮＡと、センスＲＮＡとにより分子内塩基配列が組まれていることを特徴とする、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項２】　ヘアピンループ部分を２つ有しており、ハンマーヘッド型であることを特徴とする、請求項１に記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項３】　ハンマーヘッド型であり且つ環状であることを特徴とする、請求項２に記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項４】　ハンマーヘッド型であり且つ一箇所にニックを有していることを特徴とする、請求項２に記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項５】　ハンマーヘッド型であり且つステム部分のセンスＲＮＡ側にニックを一箇所有していることを特徴とする、請求項４に記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項６】　ループ部分に少なくとも１つのホスホロチオエート結合を有していることを特徴とする、請求項１－５の何れか一つに記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項７】　ループ部分がすべてホスホロチオエート結合であることを特徴とする、請求項１、２、４又は５に記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項８】　ウィルスのＲＮＡ遺伝子に対して相補的であるアンチセンスＤＮＡを有していることを特徴とする、請求項１－７の何れか一つに記載のハイブリットＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項９】　ウィルスがＨＩＶ（Human Immunodeficiency Virus)であることを特徴とする、請求項８に記載のハイブリットＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド。
【請求項１０】RD5（配列番号 1）：
【化１】



（式中、Ａはアデノシン残基、Ｔはチミジン残基、Ｇはグアノシン残基、Ｃはシチジン残基を意味し、小文字のａ、ｕ、ｇ及びｃは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合であり、ｐは燐酸基を意味する）にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項１－９の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項１１】RD5C（配列番号 2）：
【化２】



（式中、Ａはアデノシン残基、Ｔはチミジン残基、Ｇはグアノシン残基、Ｃはシチジン残基を意味し、小文字のａ、ｕ、ｇ及びｃは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合である）にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項１－９の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項１２】RD5S（配列番号 2 に相当）：
【化３】



（式中、Ａはアデノシン残基、Ｔはチミジン残基、Ｇはグアノシン残基、Ｃはシチジン残基であり、小文字のａ、ｕ、ｇ及びｃは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ｓはホスホロチオエート結合であり、他のヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合であり、ｐは燐酸基を意味する）にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項１－９の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項１３】請求項１－１２の何れか一つに記載のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドを有効成分として含有していることを特徴とする、抗ウィルス剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】本発明は、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する抗ウィルス剤に係る。
【０００２】
【従来の技術】疾患に係る遺伝子を核酸断片により不活化し、生体に望ましくない遺伝子産物を産生させなくしたり、寄生生物の増殖を抑制して遺伝子治療を行なう方法は「アンチセンス技術」として近年医学分野で脚光を浴びている。アンチセンス法は高い可能性を秘めた魅力的な遺伝子制御方法であるが、実際に医療の場において使用する場合には、アンチセンス分子の投与方法、ドラッグデリバリーシステムへの利用、ドラッグターゲッティングシステムへの利用、代謝安全性、低免疫原性、体内排泄、高活性体であること等の条件を満たすことが最低限必要であり、未だこのような、機能性に富みしかも安全性の高いアンチセンス分子は発見されていない〔"Biochemistry", Vol. 16, page 1988 (1977)「アンチセンス技術」及び "Proc, Natl. Acad. Sci. USA,", Vol. 84, page 7706 (1987)「エイズウィルス阻害法」等〕。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】一本鎖ＲＮＡを遺伝子

とするレトロウィルスは、宿主細胞内で複製し増殖する寄生体であり、宿主細胞の働きを利用して増殖に必要なタンパク質を合成する。レトロウィルスが宿主細胞に感染すると、逆転写酵素（"ReverseTranscriptase"、以下「rev タンパク質」と称する）の働きによりＲＮＡからＤＮＡが合成される。後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすＨＩＶ（HumanImmunodeficiency Virus）もレトロウィルスに属し、Ｔ４リンパ球を宿主細胞とし、その細胞内で複製し増殖する。

【０００４】レトロウィルスの代表例として、ＨＩＶライフサイクルを図１に示す。ＨＩＶの親ウィルスが宿主細胞に吸着するとウィルスＲＮＡが逆転写酵素により一本鎖ＤＮＡに転写され、二本鎖ＤＮＡになって染色体ＤＮＡに組み込まれる。このプロウィルスＤＮＡは、潜伏期間中に宿主の染色体ＤＮＡと共に複製される。このＤＮＡは様々な機能を有し、何らかの刺激が与えられると、ＲＮＡへの転写が行われ、ＨＩＶの子ウィルスが発生する。従って、宿主細胞のタンパク質合成系においてｍＲＮＡからタンパク質が合成されるステップで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを結合させることができれば、ウィルス増殖を効果的に阻止することができる筈である。

【０００５】しかしながら、ターゲット遺伝子の特定領域の塩基配列に相補的な塩基配列を有するだけのアンチセンスオリゴヌクレオチドを生体内に導入しても、生体内に存在する種々の核酸分解酵素〔ヌクレアーゼ（Nuclease)〕により簡単に分解されてしまい、ターゲット遺伝子と結合する前に消失し、目的とする効果を得ることは事実上不可能であるか、或いは極めて困難である。これを解決するために、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが一般に利用されているが、ホスホロチオエート結合はＲ体とＳ体の混合重合体であるために、ターゲットに対する塩基対形成能が低下する。そこで、ターゲット部位にはホスホロチオエート結合を使用せず、核酸分解酵素に対する耐性を増加することが必要となる。

【０００６】本発明者等は生体内で安定に存在し、しかもターゲット領域の遺伝子に対する結合能が低下しないアンチセンスオリゴヌクレオチドを得るべく鋭意検討した結果、少なくともヘアピンループ部分を２つ有しており、標的ＲＮＡに相補的なアンチセンスＤＮＡと、センスＲＮＡとで、分子内塩基配列を組むことを特徴とする、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドによって上記の課題を解決することができることを見い出し、且つこのようなオリゴヌクレオチドが安全性において優れていることを見い出して本発明を完成するに至った。

【０００７】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、少なくともヘアピンループ部分を２つ有しており、標的ＲＮＡに相補的なアンチセンスＤＮＡと、センスＲＮＡとで、分子内塩基配列を組むことを特徴とする、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドを提供するものである。更に、本発明は該ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド類を有効成分として含有していることを特徴とする、抗ウィルス剤を提供するものである。

【０００８】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドの数例を示せば下記の通りである。

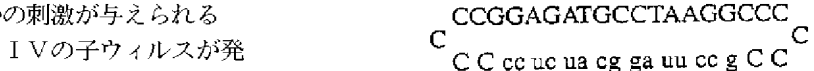
【０００９】RD5（配列番号 1）：

【化４】



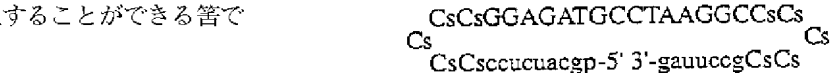
RD5C（配列番号 2）：

【化５】



RD5S（配列番号 3）：

【化６】



（上記の各式中において、Ａはアデノシン残基、Ｔはチミジン残基、Ｇはグアノシン残基、Ｃはシチジン残基を意味し、小文字のａ、ｕ、ｇ及びｃは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ｓはホスホロチオエート結合であり、他のヌクレオチド間の結合は、ホスホジエステル結合であり、ｐは燐酸基を意味する）

【００１０】尚、上記のオリゴヌクレオチド以外にも、以下の条件を満たすものであれば同様な活性を有していることが予測され、従って本発明は本明細書に具体的に開示された化合物に限定されるものではない。

【００１１】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドについての特性は以下に記載されている通りに纏めることができる。即ち、本発明のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは標的ＲＮＡに対して相補的な塩基配列からなるアンチセンスＤＮＡ領域と、センスＲＮＡ領域とを含んでいる。ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドを細胞内に存在させると、例えば、宿主細胞内でハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドのＲＮＡ領域が分解され、アンチセンスＤＮＡ領域が露呈し、宿主細胞の核からウィルスのゲノムＲＮＡが放出された場合に、そのゲノムＲＮＡにアンチセンスＤＮＡ領域が結合し、細胞質内の酵素によってゲノムＲＮＡが分解されるので、子ウィルスの発生を防止することができる。又、宿主細胞の染色体ＤＮＡに取り込まれたウィルスＤＮＡから転写されたｍＲＮＡが、宿主細胞の核から細胞質に放出された場合にも、そのｍＲＮＡに露呈したアンチセンスＤＮＡ領域が

結合し、タンパク質の翻訳をブロックするか、或いは細胞質内の酵素によってｍＲＮＡが分解されるので、この場合にも子ウィルスの発生を防止することができる。

【００１２】標的となるＲＮＡは、ＲＮＡ遺伝子、またはｍＲＮＡの内、本発明のアンチセンスＤＮＡ領域と結合させてＲＮＡの複製、ｍＲＮＡへの転写及び／又はｍＲＮＡからタンパク質への翻訳、更にはＲＮＡからＤＮＡへの逆転写を阻害し、それらＲＮＡが有する正常な機能を発揮させないようにされる対象となるＲＮＡである。

【００１３】標的ＲＮＡとしては、ＲＮＡウィルス、例えばインフルエンザウィルス、ライノウィルス、ポリオウィルス、ＨＩＶ、ＨＴＬＶ－１等のＲＮＡ遺伝子の部分塩基配列、例えばタンパク質合成開始部位などを選択することができ、又ＤＮＡ遺伝子からのｍＲＮＡやＲＮＡウィルスのプロウィルスＤＮＡから転写されるｍＲＮＡの全配列又は部分配列、特に rev タンパク質をコードする rev 領域又はその部分配列を挙げることができる。

【００１４】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び／又はそれらの修飾体から形成することができ、塩基数は特に限定されるものではないが、２つのヘアピンループ構造を形成することができ、相補的塩基配列を決める最小の単位は、一般的は３８－７６塩基であり、ヘアピンループ構造が２つ以上の場合はこれに限定されるものではない。

【００１５】ヘアピンループ構造は、環状一本鎖のループ領域と、そのループ領域端部から始まる二本鎖のステム領域とからなり、ヘアピンループ構造を構成する塩基数は特に限定されるものではないが、一般にはループ領域は４－８塩基、ステム領域は１５－３０塩基である。アンチセンス領域は前記のヘアピンループ構造と別個に形成されていても、或いはアンチセンス領域の全体または一部がヘアピンループ構造の全体または一部と一致していても差し支えはない。

【００１６】アンチセンス領域を構成する塩基数は特に限定されるものではなく、一般に１５－４６塩基である。本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド内においてアンチセンス領域は連続して存在する必要はなく、標的ＲＮＡと二重鎖を形成することができる限り、非相補的塩基１またはそれ以上が１またはそれ以上の箇所で相補的塩基対配列内に介在していても差し支えない。

【００１７】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス領域以外の各燐酸エステルの内で少なくとも１箇所以上にホスホロチオエート結合を導入することができる。ホスホロチオエート結合とは、燐酸ジエステル結合の酸素原子を硫黄原子で置換したものである。ホスホロチオエート結合を導入した部位は、ヌクレアーゼに対する分解抵抗性が向上するので、ホスホロチオエート結合の導入数は多い程好ましいが、アンチセンスＤＮＡ領域に導入するのは RNase H に対する特異性が低下するので好ましくない。

【００１８】尚、ホスホロチオエート結合を環状ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドに導入する場合にはステム領域及びループ領域を構成する塩基数により、その導入数を調整する必要がある。これはループ領域を全てホスホロチオエート結合になした場合には、ステム領域の塩基数によって RNase H に対する安定性も向上し、RNase H により分解され難い環状ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドが形成されることがあるためである。

【００１９】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート結合を導入する部位を除いては、通常のホスホジエステル法またはホスホトリエステル法、例えば H-ホスホネート法、またはホスホロアミダイト法等によるＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機を利用して合成することができる。ホスホロチオエート結合を有するハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、通常のポリヌクレオチド合成に用いられる酸化剤で水／沃素／ピリジン／テトラヒドロフランの代わりに、１５％Ｎ，Ｎ，Ｎ′，Ｎ′-テトラエチルチオラムジスルフィド ／アセトニトリルを用いて合成することができる。

【００２０】更に、本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、アンチセンスＤＮＡ領域とセンスＤＮＡ領域が安定なハイブリッド塩基対を形成するので、生体内に存在するヌクレアーゼによる分解に対しても抵抗性を有している。

【００２１】ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドの安定性の指標としては、例えば融解温度（以下「Tm」と称する）を用いることができる。一般に、オリゴヌクレオチドをホスホロチオエート型にすると Tm 値は下がり、塩基対の安定性は減少する。しかしながら、本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドのハイブリッド型であり、分子内で安定した塩基対を形成することができるので、通常のデオキシリボヌクレオチドのみのＤＮＡ／ＤＮＡオリゴヌクレオチドと比較する場合に、Tm値は上昇し、塩基対は安定化する。又、ホスホロチオエート結合はアンチセンス領域には導入されないので、標的ＲＮＡとの塩基対形成能は低下しない。

【００２２】翻って、生体内には数々のヌクレアーゼが存在する。例えば、3’方向から分解する 3’-エキソヌクレアーゼ、5’方向から分解する 5’-エキソヌクレアーゼや、中程から切断するエンドヌクレアーゼ、更にＤＮＡ又はＲＮＡの二重鎖を認識してＤＮＡ又はＲＮＡのみを分解する酵素（例えば RNase H）が存在する。後述

の実施例において示されているように、本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは 3'-エキソヌクレアーゼ（ヘビ毒ホスホジエステラーゼ）やエンドヌクレアーゼ（SI ヌクレアーゼ）の分解活性に対して抵抗性を有している。更に、細胞培養等の培地に用いる牛血清にも種々のヌクレアーゼが含まれているが、本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは牛血清中のヌクレアーゼに対しても抵抗性を有しているために牛血清含有培地からハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドを細胞に導入することが可能である。

【００２３】尚、アンチセンス法において重要な作用に、標的となるｍＲＮＡに結合して形成される細胞内のＤＮＡ／ＲＮＡ二重鎖の内で、ＲＮＡを特異的に切断するリボヌクレアーゼ（RNase H）の働きがある。これを利用すれば、細胞内のタンパク質合成を阻害してウィルスの増殖を防止することができる。

【００２４】本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、ｍＲＮＡとの結合力乃至安定性が高いために、他のアンチセンスＤＮＡよりも有効な薬剤となり得る。以下においては実施例により本発明を更に具体的に且つ詳細に説明するが、本発明は実施例に記載される化合物、用途に限定されるものではないことに留意され度い。

【００２５】

【発明の実施の形態】

実施例１：オリゴヌクレオチドの合成

本実施例では、ＨＩＶの rev タンパク質をコードするｍＲＮＡに対する１種類のターゲットＲＮＡと、１種類のセンスオリゴヌクレオチドと、７種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（２種類の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと、５種類のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチド）とを合成した。それらの構造は下記の通りである。

【００２６】

sense-RNA（45mer HIV-1 rev RNA、配列番号 4）：

【化７】

5'-uguuucacaacaaaagccuuaggcaucuccuau-ggcaggaagaag-3'

sense-ODN（配列番号 5）：

【化８】

5'-GCCTTAGGCATCTCC-3'

anti-ODN（配列番号 6）：

【化９】

5'-GGAGATGCCTAAGGC-3'

anti-ODNS（配列番号 6 に相当）：

【化１０】

5'-GsGsAsGsAsTsGsCsCsTsAsAsGsGsCs-3'

RD5（配列番号 1）：

【化１１】

CCGGAGATGCCTAAGGCCC
C　　C
CCccucuacgp-5' 3'-gauuccgCC

RD5C（配列番号 2）：

【化１２】

CCGGAGATGCCTAAGGCCC
C　　C
C C cc uc ua cg ga uu cc g C C

RD5S（配列番号 3）：

【化１３】

CsCsGGAGATGCCTAAGGCCsCs
Cs　　Cs
CsCsccucuacgp-5' 3'-gauuccgCsCs

DRL5（配列番号 7）：

【化１４】

C C gc cu ua gg ca uc uc c C C-3'
C
CCCGGAATCCGTAGAGGCCCp-5'

DRL5S（配列番号 7 に相当）：

【化１５】

Cs Cs gc cu ua gg ca uc uc c Cs C-3'
Cs
CsCsCGGAATCCGTAGAGGCsCsCsp-5'

（これらの式中において、Ａはアデノシン残基、Ｔはチミジン残基、Ｇはグアノシン残基、Ｃはシチジン残基を意味し、小文字のａ、ｕ、ｇ及びｃは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ｓはホスホロチオエート結合であり、ｐは燐酸基を意味する）

【００２７】上記のＲＮＡオリゴヌクレオチド、ＤＮＡオリゴヌクレオチド、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドの合成はホスホロアミダイト法により且つＤＮＡ／ＲＮＡ自動合成機（ABI 社製）を用いて合成した。ホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチド（anti ODNS、RD5S 及び DRL5S）は通常のポリヌクレオチド合成に用いられる酸化剤である水／沃素／ピリジン／テトラヒドロフランの代わりに、１５％ N,N,N',N'-テトラエチルチオラムジスルフィド／アセトニトリルを用いて合成した。ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドの環状化は Chemical phosphorylation reagent（Glen Research 社製）を用いて、5' 末端を燐酸化させたハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドをホスホロアミダイト法で合成した後に、T4 DNA リガーゼを用いてライゲーションすることにより得た。調製したオリゴヌクレオチドはポアクリルアミド電気泳動（PAGE）により分離し、ゲルから抽出し、エタノール沈殿または透析することにより精製した。

【００２８】実施例２：オリゴヌクレオチドの Tm（融解温度）測定

本実施例では、オリゴヌクレオチドの塩基対を形成させた後に温度を上昇させて吸光度曲線を求め、塩基対が剥

がれる温度（Tm）を指標として塩基対の安定性を評価した。前記の実施例１で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド0.15O.D. 260を 10mM Na_2HPO_4-NaH_2PO_4（pH 7.0)、10mM NaCl 緩衝液により調製し、90℃ で 10 分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷却して、塩基対を形成させた。反応液を UV セルに移し替え、1 分間に 1℃ づつ上昇させながら、UV 測定器（島津製作所製の UV-2200A）で波長 260nm における吸光度を測定した。得られた吸光度曲線の一次微分により極大値 を算出し、これを Tm 値とした。 温度（℃）と変性度（%）との関係を図２－図７に示す。又、図２－図７の吸光度曲線より算出した Tm 値を下記の表１に示す。

【００２９】

【表１】

Sequence	Tm (℃)
sense-ODN + anti-ODN	40
sense-ODN + anti-ODNS	33
sense-RNA + anti-ODN	41
sense-RNA + anti-ODNS	28
RD5	55
RD5C	81
RD5S	55
DRL5	65
DRL5S	65

【００３０】sense-ODN + anti-ODN や sense-RNA + anti-ODN と比較する場合に、sense-ODN + anti-ODNS と sense-RNA + anti-ODNS は Tm が下がり、一本鎖オリゴヌクレオチドへのホスホチオエート結合の導入では、塩基対形成能が低下した。RD5S では RD5 と同様に Tm は低下せず、ループ部分へのホスホロチオエート結合の導入は塩基対形成能を低下させることがなく、有効であった。又、RD5C のTm は RD5 より高くなり、環状化することにより塩基対形成能が上昇し、オリゴヌクレオチドに安定化がもたらされることが判明した。

【００３１】実施例３：ヘビ毒ホスホジエステラーゼを用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本実施例では、オリゴヌクレオチドを 3'-エキソヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼであるヘビ毒ホスホジエステラーゼ（以下「SVPD」と称する）を用いて、ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行った。SVPD は、通常の未修飾のオリゴヌクレオチドであれば、これを速やかに分解する。前記実施例１で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.1 O.D. 260 を 10mM Tris-HCl（pH 8.5)、10mM $MgCl_2$ 及び 100mM NaCl から調製した緩衝液 0.7ml に溶解し、SVPD （ベーリンガーマンハイム社製）0.1μg を加えて、37℃ で保温しながら、UV 測定器（島津製作所製の UV-2200A）により波長 260nm での吸光度を1 時間測定した。結果は図８に示されている通りであった。

【００３２】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は経時的に分解され、10 分後には大部分が分解されてしまった。これに対して RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及びDRL5S は殆ど分解されなかった。これにより、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドはアンチセンス部分にホスホロチオエート結合を導入しなくても3'-エキソヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼである SVPD に対して強い分解抵抗性を示すことが明らかとなった。

【００３３】実施例４： SI ヌクレアーゼを用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本実施例では、オリゴヌクレオチドをランダムに切断するエンドヌクレアーゼ活性を示す SI ヌクレアーゼを用いて、このヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行った。SI ヌクレアーゼは、通常の未修飾のオリゴヌクレオチドであれば、これを速やかに分解する。前記実施例１で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.1 O.D. 260 を 30mM CH_3COONa（pH 4.6)、280mM NaCl 及び 1mM $ZnSO_4$ から調製した緩衝液 0.7ml に溶解し、SI ヌクレアーゼ（Takara社製）27.5 units を加えて 37℃ で保温しながら、UV 測定器（島津製作所製製の UV-2200A）により波長 260nm での吸光度を 1 時間測定した。結果は図９に示される通りであった。

【００３４】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は経時的に分解され、10 分後には大部分が分解されてしまった。これに対して RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及びDRL5S は殆ど分解されなかった。殊に、RD5C はホスホロチオエート結合を導入した一本鎖のオリゴヌクレオチドである anti-ODNS よりも分解されなかった。ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドはアンチセンス部分にホスホロチオエート結合を導入しなくてもエンドヌクレアーゼ活性を示す SI ヌクレアーゼに対して強い分解抵抗性を示すことが明かになった。

【００３５】実施例５：ウシ血清を用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本試験例では、１０％ FBSMEM 培地に対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行なった。前記の実施例１で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.2 O.D.260 を 10％ FBS MEM 培地 100μl に添加し、37℃ で保温しながら、3、6、12及び 24 時間反応させた。それぞれの反応液 20μl に水 20μl 及びフェノール: クロロホルム (1 : 1) 20μl を添加して撹拌し、15000 rpm で 10 分間遠心処理し、水層を抽出した。得られた水層 20μl を遠心エバポレート後、7M 尿素溶液 10μl に溶解させ、10% PAGE、7M 尿素、TBE で分析した。結果は図１０に示される通りであった。未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODM が 24 時間後には完全に分解されたのに対して、RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及び DRL5S は 24 時間後においても一部が分解されずに残留した。これから、本発明によるハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドはアンチセンス部分にホスホロチオエート結合を導入しなくても血清に対して分解抵抗性を示すことが明らかになった。

【００３６】実施例６：オリゴヌクレオチドによる RNase H での標的ＲＮＡの分解

本実施例では、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドの RNase Hによる分解と、その分解によって露呈されたアンチセンス部分と標的ＲＮＡとの塩基対形成後の RNase H による標的ＲＮＡの分解能力を評価した。前記実施例１で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.33nmol と標的ＲＮＡ 0.33nmolを 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)、10mM $MgCl_2$、100m KCl、1mM DTT 緩衝液、RNase H 7.5 units、RNasin 12.7 units で 37℃ 1、２ 又は 4 時間反応させ、70%濃度となるように EtOH を添加し、-20℃ で 30 分間以上冷却した後、15000rpm で 15 分間遠心処理することにより沈殿を得た。得られた沈殿を 9M尿素溶液 5μl に溶解し、10% PAGE、TBE、50℃ の条件下で分析した。但し、オリゴヌクレオチドは反応前に 90℃ で５分間加熱し、室温になるまで徐々に冷却したものを使用した。結果は図１１及び１２に示される通りであった。

【００３７】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は標的ＲＮＡを 4 時間後にほぼ完全に分解した。ホスホロチオエート結合を導入した anti-ODNS の場合には4 時間後でも標的ＲＮＡが一部分分解されずに残留した。一本鎖オリゴヌクレオチドへホスホチオエート結合を導入することにより、RNase H による標的ＲＮＡの分解能は低下した。RD5 と RD5C の場合には RNase H による標的ＲＮＡの分解はanti-ODN に比べて遅いが、標的ＲＮＡを分解した。分解が遅い理由は、一端、自体のセンスＲＮＡ領域が RNase H により分解されないと、その後のアンチセンス領域と標的ＲＮＡとの二重鎖の形成、標的ＲＮＡの分解ができないからである。RD5S、DRL5 及び DRL5S の場合には RNase H による標的ＲＮＡの分解能はかなり低下したが、これは、自体のセンスＲＮＡ領域が RNase H により分解され難いことに起因するものと推定された。これらの結果から、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドはヘアピンループ構造をとっていても、RNase H によって標的ＲＮＡを分解する活性を有していることが判明した。

【００３８】

【発明の効果】本発明のハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、それ自身で安定化した塩基対を形成し、生体内の各種ヌクレアーゼの分解に対して抵抗性を有しており、生体内、殊に標的部位の RNase H によって自己のセンスＲＮＡ領域が分解され、露呈されたアンチセンスＤＮＡ領域が標的となるＲＮＡと二重鎖を形成し標的ＲＮＡを分解する。更に、このハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドは標的ＲＮＡを分解することから、ハイブリッドＤＮＡ／ＲＮＡオリゴヌクレオチドを含有する抗ウィルス剤は、ウィルスの増殖を阻害することができる。

【配列表】

配列番号 : 1
配列の長さ : 40
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
アンチセンス : Yes
配列
gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCCC CCCgccuuag

配列番号 : 2
配列の長さ : 40
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 環状
配列の種類 : ペプチド
アンチセンス : Yes
配列
gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCCC CCCgccuuag

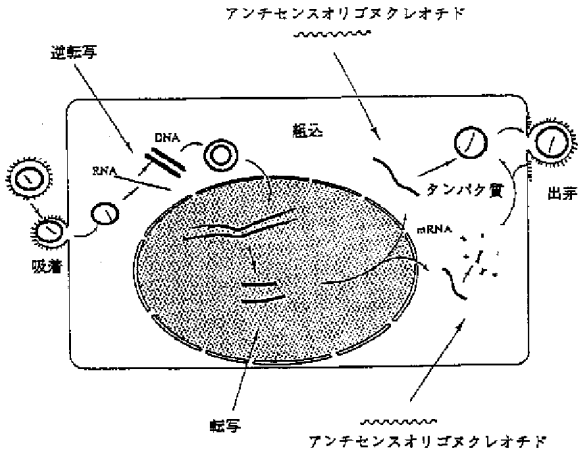
配列番号 : 3
配列の長さ : 40
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
アンチセンス : Yes
配列
gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCCC CCCgccuuag

配列番号 : 4
配列の長さ : 45
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状

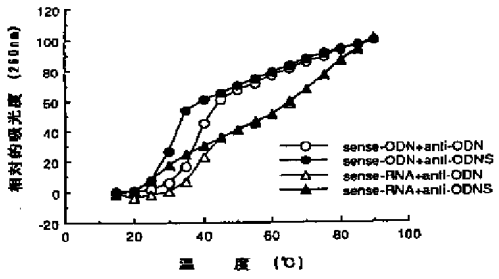
配列の種類 ： ペプチド
アンチセンス ： No
配列
uguuucacaa caaaagccuu aggcaucucc uauggcagga agaag
配列番号 ： 5
配列の長さ ： 15
配列の型 ： 核酸
鎖の数 ： 一本鎖
トポロジー ： 直鎖状
配列の種類 ： ペプチド
アンチセンス ： No
配列
GCCTTAGGCA TCTCC
配列番号 ： 6
配列の長さ ： 15
配列の型 ： 核酸
鎖の数 ： 一本鎖
トポロジー ： 直鎖状
配列の種類 ： ペプチド
アンチセンス ： Yes
配列
GGAGATGCCT AAGGC
配列番号 ： 7
配列の長さ ： 40
配列の型 ： 核酸
鎖の数 ： 一本鎖
トポロジー ： 直鎖状
配列の種類 ： ペプチド
アンチセンス ： Yes
配列
CCCGGAGATG CCTAAGGCCC CCCgccuuag gcaucuccCC

【図面の簡単な説明】
【図１】HIV のライフサイクルを示す説明図である。
【図２】sense-ODN + anti-ODN、sense-ODN + anti-ODN S、sense-RNA + anti-ODN 及びsense-RNA + anti-ODNS の場合の融解温度曲線である。
【図３】図２に示された融解温度の一次微分曲線である。
【図４】RD5、RD5C、RD5S 及び RD5SC の場合の融解温度曲線である。
【図５】図４に示された融解温度の一次微分曲線である。
【図６】DR5、DR5S、DRL5 及び DRL5S の場合の融解温度曲線である。
【図７】図６に示された融解温度の一次微分曲線である。
【図８】ヘビ毒ホスホジエステラーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示すグラフである。
【図９】SI ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示すグラフである。
【図１０】ウシ血清に対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示す電気泳動の撮影像である。
【図１１】オリゴヌクレオチドによる RNase H での標的 RNA に対する分解能を電気泳動により調べた結果を示す撮影像である。
【図１２】図１１と同様の、但し他のヌクレオチドの場合を示す撮影像である。

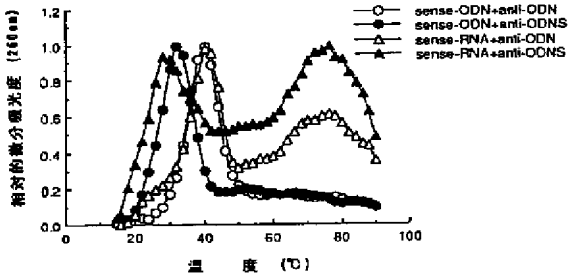
【図１】



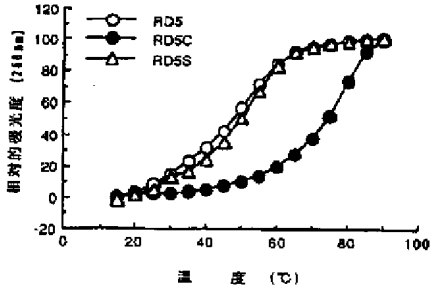
【図２】



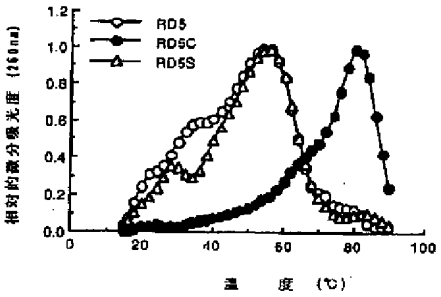
【図３】



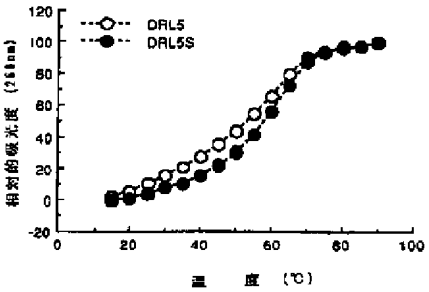
【図４】



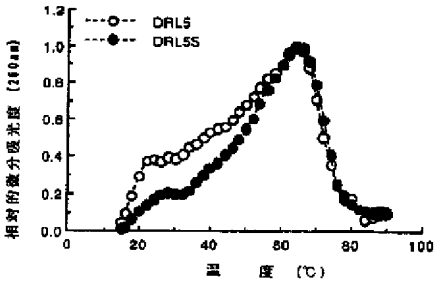
【図５】



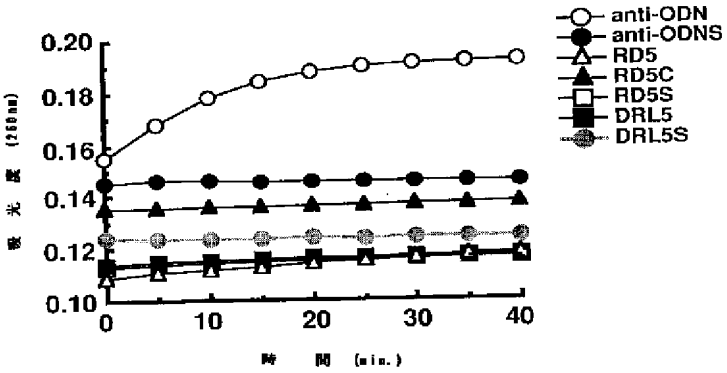
【図６】



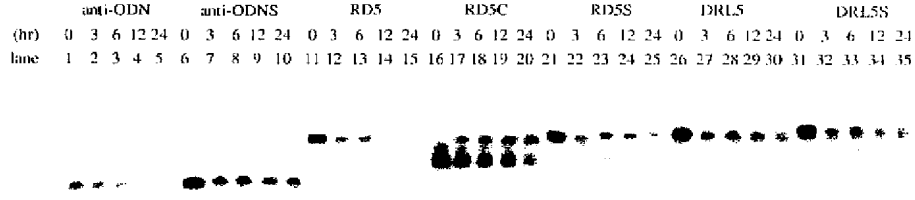
【図７】



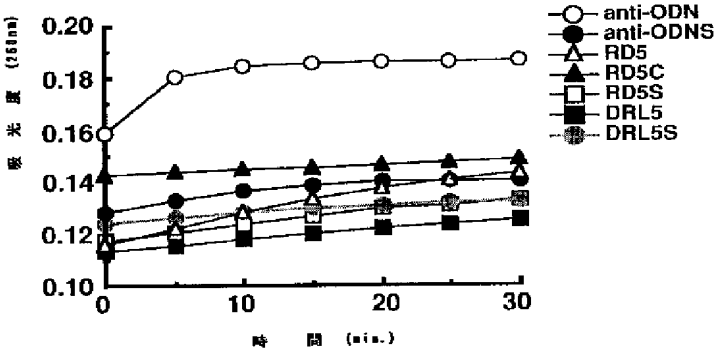
【図８】



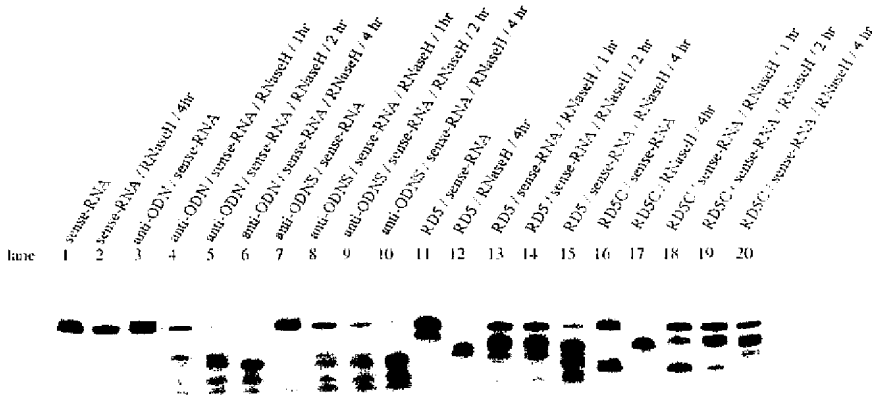
【図１０】



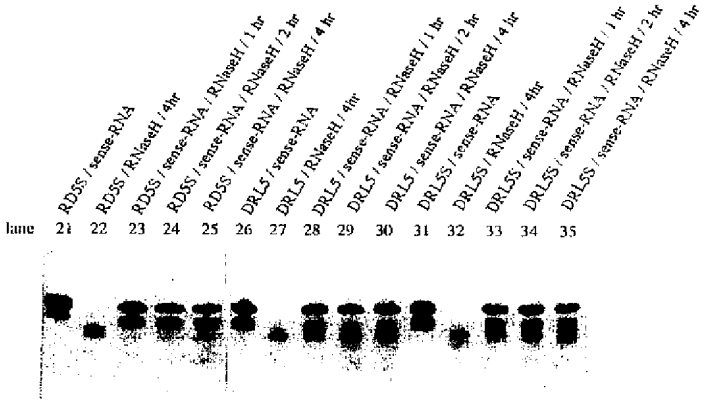
【図９】


anti-ODN
anti-ODNS
RD5
RD5C
RD5S
DRL5
DRL5S
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0
10
20
30
時　間　(min.)

【図１１】


lane 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
sense-RNA
sense-RNA / RNaseH / 4hr
anti-ODN / sense-RNA
anti-ODN / sense-RNA / RNaseH / 1hr
anti-ODN / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
anti-ODN / sense-RNA / RNaseH / 4 hr
anti-ODNS / sense-RNA
anti-ODNS / sense-RNA / RNaseH / 1hr
anti-ODNS / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
anti-ODNS / sense-RNA / RNaseH / 4 hr
RD5 / sense-RNA
RD5 / RNaseH / 4hr
RD5 / sense-RNA / RNaseH / 1 hr
RD5 / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
RD5 / sense-RNA / RNaseH / 4 hr
RD5C / sense-RNA
RD5C / RNaseH / 4hr
RD5C / sense-RNA / RNaseH / 1 hr
RD5C / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
RD5C / sense-RNA / RNaseH / 4 hr

【図１２】


lane 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
RD5S / sense-RNA
RD5S / RNaseH / 4hr
RD5S / sense-RNA / RNaseH / 1 hr
RD5S / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
RD5S / sense-RNA / RNaseH / 4 hr
DRL5 / sense-RNA
DRL5 / RNaseH / 4hr
DRL5 / sense-RNA / RNaseH / 1 hr
DRL5 / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
DRL5 / sense-RNA / RNaseH / 4 hr
DRL5S / sense-RNA
DRL5S / RNaseH / 4hr
DRL5S / sense-RNA / RNaseH / 1 hr
DRL5S / sense-RNA / RNaseH / 2 hr
DRL5S / sense-RNA / RNaseH / 4 hr